

## BIOMODIFICAÇÃO DOS TECIDOS DENTÁRIOS AFETADOS PELA HMI COMO ESTRATÉGIA DE REFORÇO DA ESTRUTURA E REMINERALIZAÇÃO

Ana Carolina Silva Rossi Pereira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Débora Lopes Salles Scheffel (Orientadora), e-mail: [ra109873@uem.br](mailto:ra109873@uem.br)

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

### Odontologia – Materiais odontológicos (4.02.09.00-8)

**Palavras-chave:** hipomineralização molar incisivo, remineralização, glutaraldeído

### Resumo

A Hipomineralização Molar Incisivo (HMI) possui uma etiologia multifatorial e afeta de um a quatro primeiros molares permanentes, podendo haver o envolvimento de incisivos. Este trabalho avaliou o efeito de um agente formador de ligações cruzadas (glutaraldeído) associado a nanopartículas de cerâmica bifásica na remineralização de tecidos afetados pela HMI. Para isso, espécimes de esmalte e dentina afetados por HMI (3x3x2 mm) foram obtidos em cortadeira metalográfica. Os espécimes foram submetidos a análise físico-química por meio de um microscópio Raman Confocal selecionando 15 pontos aleatórios na superfície afetada da dentina e 12 pontos aleatórios na superfície afetada do esmalte. Então, os espécimes foram divididos em 4 grupos, de acordo com o tratamento de superfície: água (controle); glutaraldeído (GA); cerâmica bifásica (CB) e GA seguido pela aplicação da CB (GA+CB) (n=4). Todas as soluções foram aplicadas sobre a dentina ou o esmalte por 1 minuto, seguido por 10 segundos de enxague com água deionizada. Após os tratamentos, os espectros Raman foram novamente coletados. As áreas dos picos para fosfato e amida foram calculadas para e submetidas aos testes de Kruskal-Wallis e ANOVA, complementados respectivamente pelos testes de Dunn e Tukey ( $\alpha=0,05$ ). A dentina tratada com CB apresentou a maior área para o pico de fosfato. Para a amida, somente o grupo CB+GA diferiu dos demais ( $p<0,05$ ). No esmalte o maior conteúdo inorgânico foi observado para o grupo GA+CB. Assim, conclui-se que o tratamento com GA+ CB apresentou resultados tecido-dependente, sendo especialmente efetivo para o esmalte hipomineralizado.

### Introdução

A hipomineralização molar incisivo (HMI) possui etiologia multifatorial, ainda não bem estabelecida, e afeta de um a quatro primeiros molares permanentes com ou sem o envolvimento de incisivos (Weerheijm et al., 2001). A HMI se apresenta como opacidades demarcadas que podem variar do branco-cremoso ao marrom. Dentes afetados pela HMI podem sofrer fraturas pós-eruptiva, apresentar maior suscetibilidade à cárie e maior risco de extrações (Weerheijm et al., 2004).

A biomodificação de tecidos pelo aumento do número de ligações cruzadas intra e intermoleculares em proteínas tem sido usada em diferentes áreas das ciências médicas. Como exemplo de agentes formadores de ligações cruzadas (cross-linkers) temos o glutaraldeído (GA), que ao ser aplicado sobre válvulas aórticas porcinas e biopróteses cardíacas de pericárdio bovino, torna-as mais estáveis e resistentes à degradação (Baucia et al., 2006). No entanto, um efeito adverso da utilização do GA nestes tecidos é o maior risco de calcificação grave após o transplante (Lee et al., 2011; Lee et al., 2012). Apesar desse processo ser indesejado para o tratamento de doenças cardíacas, pode-se encontrar valor terapêutico para dentes hipomineralizados. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de um agente formador de ligações cruzadas (glutaraldeído) associado a nanopartículas de cerâmica bifásica na remineralização de tecidos afetados pela HMI.

## Materiais e Métodos

*Obtenção das nanopartículas de composto cerâmico bifásico de fosfato de cálcio:* Nanopartículas de cerâmica bifásica à base de fosfato de cálcio (CB) entre 20-40 nm foram obtidas a partir de ossos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com 90 dias de idade, descartados como resíduos, de acordo com a carta patente PI0506242-0 (Título: "PRODUÇÃO E OBTENÇÃO DE HIDROXIAPATITE VIA CALCINAÇÃO DO OSSO DE PEIXE". Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 06/09/2005; Concessão: 07/03/2017). Os ossos foram calcinados a 900°C por 8 horas em forno para remover todo o conteúdo orgânico (Quimis-Q318M35T-br) (WEINAND et al., 2022). Após este processo foi obtida uma amostra final contendo  $69,43 \pm 0,24$  % em peso da fase  $\beta$ -TCP ( $\beta$ -fosfato tricálcico) e  $30,57 \pm 0,15$  % em peso da fase de hidroxiapatita (HAp). As nanopartículas foram utilizadas para preparar uma solução bioativa a partir da mistura de 1mg de CB em 1mL de água deionizada, agitando em ultrassom por 280 segundos.

*Espectroscopia Raman e tratamentos:* Espécimes de dentina e esmalte de aproximadamente 3x3x2 mm (n=4) foram obtidos de dentes com hipomineralização molar-incisivo (HMI) em cortadeira metalográfica cortadeira metalográfica ISOMET (Buehler Ltd., Lake Bluff, IL, EUA) com disco de corte de 0,3 mm sob refrigeração com água. Os espécimes foram submetidos a análise físico-química por meio de um microscópio Raman confocal (modelo Senterra, BrukerOptik GmbH, Alemanha). O sistema utiliza laser de excitação em 785 nm com potência nominal de 100 mW e abertura em forma de fenda de 25x1000  $\mu$ m. Os espectros Raman foram coletados selecionando 15 pontos aleatórios na superfície afetada da dentina e 12 pontos aleatórios na superfície afetada do esmalte. Cada espectro é uma média de 10 varreduras com 10 segundos de tempo de integração, com resolução espectral de 9-15  $\text{cm}^{-1}$  na região entre 1800 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , focado na amostra por uma lente de objetiva de 20 x de magnificação e tratados com linha de base e normalizados pelo vetor normalização via software OPUS. Após leitura inicial os espécimes foram aleatoriamente divididos em 4 grupos e tratados com: água (controle); água seguida pela aplicação de nanopartículas de cerâmica bifásica de fosfato de cálcio (CB);

glutaraldeído 5% (GA) ou GA seguido pela aplicação de BCP (GA+CB). Todas as soluções foram aplicadas sobre a dentina ou o esmalte por 1 minuto, seguido por 10 segundos de enxague com água deionizada. Então, os grupos CB e GA+CB foram tratados com a solução bioativa utilizando um microaplicador descartável (microbrush) de forma passiva por 60 segundos, seguido de lavagem por 30 segundos com água deionizada. Os espécimes foram então submetidos a leitura em espectroscopia Raman, como descrito anteriormente.

## Resultados e Discussão

Para o esmalte, os espectros exibiram bandas centradas em 430, 590, 961 e 1043 cm<sup>-1</sup> relacionadas ao grupamento fosfato e uma banda centrada em 1070 cm<sup>-1</sup> atribuída a carbonato. Já para a dentina, além das bandas presentes no esmalte também foi possível observar bandas centradas em 1270, 1453, 1665 e 2942 cm<sup>-1</sup> atribuídas a deformações de ligações químicas de NH e CH, estiramento de C=O relacionados a amida I e estiramento de CH, respectivamente. Para quantificar a porção orgânica e inorgânica da dentina foi feito o cálculo da área sob a curva das bandas centradas em 1665 e 961 cm<sup>-1</sup>, relacionadas a amida I e fosfato. A quantificação da porção inorgânica do esmalte dentário foi feita pelo cálculo da área sob a curva da banda centrada em 961 cm<sup>-1</sup>. Os dados das áreas dos picos estão apresentados na Tabela 1. O GA [399,7 (166,1-746,6)] não exerceu efeito sobre o conteúdo mineral (fosfato) da dentina afetada pela HMI em comparação ao controle [399,9 (127,5-806,5)] (p>0,9999). Os dentes tratados com a solução de BC logo após a aplicação de água apresentou a maior mediana [527,7 (443,7-784,4)] em relação a todos os outros tratamentos. Já a aplicação de GA associado a solução BC resultou nos menores valores de área do pico de fosfato [308,3 (209,8-388,2)] (p=0,0009). Em relação a amida, somente foi observada diferença para o grupo GA+BC, que apresentou a menor mediana [23,8 (11,57-31,28)]. Para o esmalte não foram observados picos referentes a matéria orgânica. A área do pico de fosfato foi maior no grupo GA+BC (2.243±379,0) (p<0,0001), seguido pelo GA (1.819±617,4) (p=0,0240). Nenhuma diferença foi observada entre os grupos BC (1.430±273,9) e o controle (1.586±450,5) (p=0,4598).

**Tabela 1.** Áreas dos picos referentes ao fosfato e amida nos tecidos dentários hipomineralizados.

Tecido	Pico	Tratamentos			
		Controle	GA	CB	GA+CB
Esmalte	Fosfato	1586 (±450,5) <sup>ac*</sup>	1819 (±617,4) <sup>b</sup>	1430 (±273,9) <sup>c</sup>	2243 (±379,0) <sup>d</sup>
	Fosfato	399,9 (127-806) <sup>a**</sup>	399,7 (166-746) <sup>a</sup>	527,7 (443-784) <sup>b</sup>	308,3 (210-388) <sup>c</sup>
Dentina	Amida	34,8 (5,8-50,6) <sup>a**</sup>	36,5 (10,4-49,2) <sup>a</sup>	37,3 (35,2-46,2) <sup>a</sup>	23,8 (11,6-31,3) <sup>b</sup>

\*Dados representam média (±desvio-padrão). ANOVA (Tukey; p<0,05).

\*\*Dados representam mediana (mínimo-máximo). Kruskal-Wallis (Dunn; p<0,05).

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante entre os tratamentos dentro do mesmo substrato e tipo de pico (linha).

## Conclusões

O tratamento com glutaraldeído seguido pela aplicação de nanopartículas de cerâmica bifásica elevou significativamente o conteúdo mineral do esmalte hipomineralizado. No entanto, para a dentina as maiores áreas dos picos de fosfato foram encontradas nos espécimes tratados somente pela cerâmica bifásica. O conteúdo orgânico da dentina foi menos influenciado pelos tratamentos.

## Agradecimentos

À Fundação Araucária, ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e à Universidade Estadual de Maringá – UEM por concessão de bolsa de Iniciação Científica.

## Referências

BAUCIA, J.A.; NET, R.; NASCIMETNO, N. Anti-calcifying treatment of glutaraldehyde fixed bovine pericardium: comparisons and evaluation of possible synergic effects. **Braz J Cardiovasc Surg**, 21(2): 180-187, 2006.

LEE, C.; AHN, H.; KIM, S.H.; CHOI, S.Y.; KIM, Y.J. Immune response to bovine pericardium implanted into  $\alpha$ 1,3-galactosyltransferase knockout mice: feasibility as an animal model for testing efficacy of anticalcification treatments of xenografts. **Eur J Cardiothorac Surg**, 42:164–72, 2012.

LEE, C.; KIM, S.H.; CHOI, S.H.; KIM, Y.J. High-concentration glutaraldehyde fixation of bovine pericardium in organic solvent and post-fixation glycine treatment: in vitro material assessment and in vivo anticalcification effect. **Eur J Cardiothorac Surg**, 39:381–7, 2011.

WEERHEIJM, K. L.; JÄLEVIK, B.; ALALUUSUA, S. Molar-incisor hypomineralisation. **Caries Res**, 35, n. 5, p. 390-391, 2001 Sep-Oct 2001.

WEERHEIJM, K. L. Molar incisor hypomineralization (MIH): clinical presentation, aetiology and management. **Dent Update**, 31, n. 1, p. 9-12, 2004 Jan-Feb 2004.